

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 15 SEP 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 40 603.0

**Anmeldetag:** 03. September 2002

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Verwendung von Malat-Dehydrogenase zur  
NADH-Regenerierung

**IPC:** C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 19. Juni 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Wehner

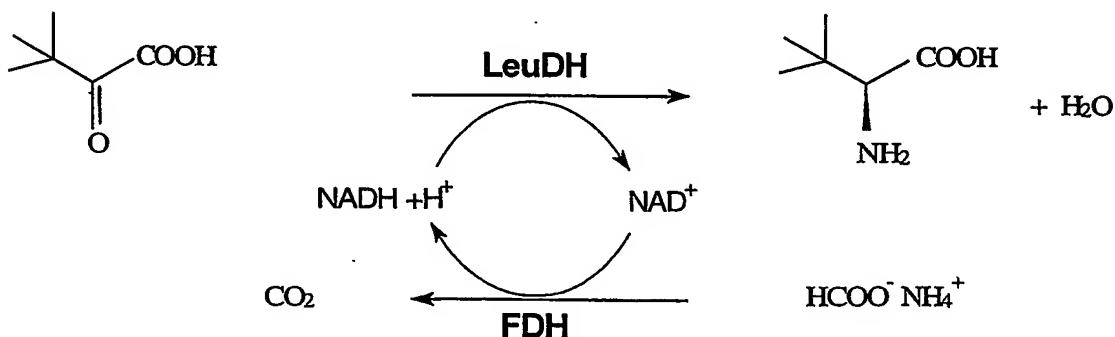
## Verwendung von Malat-Dehydrogenase zur NADH-Regenerierung

Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung enantiomerenangereicherter organischer Verbindungen gerichtet. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein enzymatisch arbeitendes Verfahren, bei dem in einem gekoppelten enzymatischen Reaktionssystem NAD(P)H zur Herstellung der organischen Verbindung von einem Enzym verbraucht und das NAD(P)H gleichzeitig durch ein zweites Enzymsystem regeneriert wird.

Ebenfalls vorgeschlagen wird ein derart erfindungsgemäß arbeitendes Reaktionssystem sowie ein vorteilhafter Ganzzellkatalysator bzw. geeignete Plasmide.

Die Gewinnung optisch aktiver organischer Verbindungen, z.B. Alkohole und Aminosäuren, auf biokatalytischem Wege gewinnt zunehmend an Bedeutung. Als ein Weg zur großtechnischen Synthese dieser Verbindungen, insbesondere von Alkoholen und Aminosäuren, hat sich u.a. der gekoppelte Einsatz zweier Dehydrogenasen unter Cofaktorregenerierung gezeigt (DE19753350, EP118750).

Schema 1:



*In situ* Regeneration von NADH mit der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bei der reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat zu L-tert-Leucin (Bommarius et al. Tetrahedron Asymmetry 1995, 6, 2851-2888).

Die im wässrigen Medium effizient eingesetzten Biokatalysatoren weisen neben ihrer katalytischen Eigenschaft und Effizienz zudem den Vorteil auf, dass im Gegensatz zu einer Vielzahl an synthetischen metallhaltigen Katalysatoren auf den Einsatz metallhaltiger, insbesondere schwermetallhaltiger und somit toxischer Einsatzstoffe verzichtet werden kann. Auch kann auf den Einsatz von teuren und zudem gefährlichen Reduktionsmitteln wie beispielsweise Boran bei der asymmetrischen Reduktion verzichtet werden.

Die bisher in diesen Systemen mit Erfolg eingesetzte FDH, z.B. aus *Candida boidinii*, hat den Nachteil, dass die spezifische Aktivität dieser Enzymklasse mit 4-8 U/mg sehr niedrig liegt. Dies bedingt den Einsatz einer großen Menge an teurem Enzym mit apparativ gesehen schwieriger Recyclierung, wenn ein so gestalteter Prozess im technischen Maßstab unter ökonomischen Gesichtspunkten vorteilhaft durchgeführt werden soll.

Die „malic enzyme“ genannte Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat. Zahlreiche Malatdehydrogenasen aus verschiedenen Organismen sind bekannt, so u.a. aus höheren Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen. Es wird zwischen vier Arten von Malatdehydrogenasen unterschieden, die in den Enzymklassen E.C. 1.1.1.37 bis EC 1.1.1.40 klassifiziert sind (<http://www.genome.ad.jp>). In Abhängigkeit vom Typ der Malatdehydrogenase wird NAD und/oder NADP als Cofaktor benötigt.

Aufgrund der Irreversibilität der oxidativen Decarboxylierungsreaktion von L-Äpfelsäure zu Pyruvat bietet sich die Nutzung der Malatdehydrogenase auch im Hinblick auf eine günstige Cofaktorregenerierung in oben geschilderten Systemen an.

Die Nutzung der Malatdehydrogenase zur Regenerierung von NAD findet sich beispielsweise bei Suye et al. in einer

Arbeit von 1992 beschrieben (S.-I. Suye, M. Kawagoe, S. Inuta, *Can. J. Chem. Eng.* **1992**, 70, 306-312). Die NADH-Regenerierung mittels der Malatdehydrogenase wird dabei zur reduktiven Aminierung von Pyruvat mittels einer

5 Alanindehydrogenase unter Verbrauch von NADH verwendet. Das Pyruvat entsteht durch die oxidative Decarboxylierung aus L-Äpfelsäure und wird im folgenden Schritt durch die Alanindehydrogenase gleich wieder verbraucht. Eine Anreicherung von Pyruvat in der Reaktionslösung wird damit

10 vermieden, womit auch das Problem eventueller Inhibierungen der beteiligten Enzyme durch die Gegenwart von Pyruvatmengen im stöchiometrischen Bereich beseitigt wird. Allerdings ist damit das vorgestellte System auf die Produktion von Alanin ausschließlich eingeschränkt (s. auch

15 S.-I. Suye, *Recent Res. Devel. Ferment. Bioeng.* **1998**, 1, 55-64).

Interessanterweise wurden - trotz des technisch hohen Potentials - außer diesen Arbeiten von der Suye-Arbeitsgruppe keine weiteren Arbeiten unter Nutzung des

20 „Malatdehydrogenase“ zur Regenerierung des oxidierten Cofaktors NAD<sup>+</sup> bei Reduktionen von Ketonen bzw. reduktiven Aminierungen von Ketosäuren beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Angabe eines weiteren Verfahrens zur Herstellung von chiralen organischen Verbindungen wie Aminosäuren oder Alkoholen,

25 welche durch ein wie oben beschriebenes gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem unter Verwendung der Malatdehydrogenase gewonnen werden können und welches nicht auf die Darstellung einer Substanz eingeschränkt ist.

30 Insbesondere sollte dieses Verfahren im technischen Maßstab unter ökonomischen wie ökologischen Gesichtspunkten besonders vorteilhaft eingesetzt werden können.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den kennzeichnenden Merkmalen des gegenständlichen Anspruchs 1

35 gelöst. Ansprüche 2 bis 7 beziehen sich auf bevorzugte

Ausführungsformen. Ansprüche 8 und 9 schützen ein erfindungsgemäßes Reaktionssystem und einen entsprechend arbeitenden Ganzzellkatalysator. Anspruch 10 schützt bevorzugte Plasmeide.

- 5 Dadurch, dass man in einem Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten organischen Verbindungen in einem gekoppelten enzymatischen Reaktionssystem aufweisend eine erste enzymatische Transformation eines organischen Substrats unter Verbrauch von NAD(P)H und die Regeneration  
10 des NAD(P)H in einer zweiten enzymatischen Transformation durch eine Malatdehydrogenase unter Oxidation von L-Äpfelsäure zu Pyruvat und CO<sub>2</sub>, das entstehende Pyruvat der zweiten enzymatischen Transformation nicht als Substrat in der ersten enzymatischen Transformation einsetzt, gelangt  
15 man überaus überraschend und dafür aber nicht minder vorteilhaft zur Lösung der gestellten Aufgabe. Es kann durchaus als Überraschung angesehen werden, dass die simultane Verwendung z.B. einer Aminosäuredehydrogenase mit der decarboxylierend wirkenden Malatdehydrogenase  
20 problemlos ohne Auftreten von Kreuzreaktionen möglich ist. Auch lassen sich keine inhibierenden Einflüsse von Substraten und Produkten der Primärreaktion auf die Malatdehydrogenase und umgekehrt nachweisen. Insbesondere fällt positiv auf, dass das als Nebenprodukt gebildete  
25 Pyruvat nicht inhibierend auf die Malatdehydrogenase selbst bzw. auf die parallel eingesetzten Alkohol- bzw. Aminosäuredehydrogenasen einwirkt.

- Vorteilhafterweise werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren enantiomerenangereicherte Alkohole oder  
30 Aminosäuren hergestellt. In diesem Fall kommen allseits bekannte und wohlfeile Alkoholdehydrogenase oder Aminosäuredehydrogenase als Enzyme für die erste enzymatische Transformation in Frage. Der Fachmann ist im Prinzip frei in deren Auswahl, die nach Art des  
35 Substratspektrums, Stabilität und Umsatzrate des

betrachteten Enzyms erfolgt. Bekannte Enzyme dieser Provenienz sind in K. Drauz, H. Waldmann (Hrsg.), Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Volume III, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, Kapitel 15 dargestellt.

- 5 Besonders vorteilhaft ist der Einsatz der Alkoholdehydrogenase aus den Organismen *Rhodococcus erythropolis* (S-ADH) oder *Lactobacillus kefir* (R-ADH) (ADH aus *R. erythropolis*: J. Peters, T. Zelinski, M.-R. Kula, Purification and characterization of a novel carbonyl reductase silated from *Rhodococcus erythropolis*, J. Biotechnol. 1994, 33, 283-292) (ADH aus *Lactobacillus kefir*: C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *Lactobacillus kefir* Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis, J. Org. Chem. 1992, 57, 1532-1536.). Im Hinblick auf
- 10 bevorzugte Aminosäuredehydrogenasen sei der Fachmann auf beispielsweise Leucindehydrogenasen bzw. Phenylalanindehydrogenasen (A. Bommarius in: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Volume III, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, Kapitel
- 15 15.3) verwiesen.
- 20

- Malatdehydrogenasen sind dem Fachmann ebenfalls geläufig (Lit. s. weiter vorne oder Dissertation S. Naamnieh, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung). Auch hier wird der Fachmann sich die für seinen Zweck am effizientesten einsetzbare Dehydrogenase auswählen. Im Prinzip sind solche
- 25 Malatdehydrogenasen bevorzugt, die das NAD(P)H in einem solchen Maße regenerieren, dass kein Engpass für den Reaktionsablauf des anderen eingesetzten Enzyms auftritt. Bevorzugt ist die bekannte Malatdehydrogenase aus *E. coli* K12 in diesem Zusammenhang. Genisolierung und Klonierung sind beschrieben in S. Naamniehs Dissertation, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung S. 70ff.
- 30

- Prinzipiell kann das gegenständliche Verfahren in rein wässriger Lösung durchgeführt werden. Es ist jedoch auch
- 35 möglich, der wässrigen Lösung beliebige Teile eines

wasserlöslichen organischen Lösungsmittels zuzusetzen, um z.B. die Reaktion im Hinblick auf schlecht wasserlösliche Substrate zu optimieren. Als solche Lösungsmittel kommen insbesondere Ethylenglykol, DME oder Glycerin in Betracht.

5 Weiterhin können aber auch Mehrphasen-, insbesondere Zweiphasensysteme aufweisend eine wässrige Phase als Lösungsmittelgemisch für das erfindungsgemäße Verfahren dienen. Hier hat sich der Einsatz bestimmter nicht wasserlöslicher Lösungsmittel schon bewährt (DE10233107).

10 Die dort diesbezüglich gemachten Aussagen gelten hier entsprechend.

Prinzipiell ist der Fachmann bei der Wahl der während der Reaktion vorhandenen Temperatur frei. Er orientiert sich vorzugsweise an dem Erhalt einer möglichst hohen Ausbeute

15 an Produkt in möglichst hoher Reinheit in möglichst kurzer Zeit. Zudem sollten die eingesetzten Enzyme unter den eingesetzten Temperaturen hinreichend stabil sein und die Reaktion sollte mit einer möglichst hohen Enantioselektivität verlaufen. Im Hinblick auf den Einsatz

20 von Enzymen aus thermophilen Organismen können durchaus Temperaturen von 100°C die obere Grenze des Temperaturbereichs bei der Reaktion darstellen. Als untere Grenze in wässrigen Systemen sind -15°C sicher sinnvoll. Vorteilhaft ist ein Temperaturintervall zwischen 10 und 60,

25 besonders bevorzugt zwischen 20 und 40°C einzustellen.

Der pH-Wert während der Reaktion wird vom Fachmann anhand der Enzymstabilitäten und Umsatzraten ermittelt und entsprechend für das erfindungsgemäße Verfahren eingestellt. Für die Malatdehydrogenase aus *E. coli* wurde

30 gefunden, dass das pH-Optimum bei > 10 liegt. Im allgemeinen wird der für Enzyme bevorzugte Bereich von pH 5 bis 11 gewählt. Vorzugsweise kann ein pH-Bereich von 5,5 bis 10,0, insbesondere 6,0 bis 9,0 vorliegen.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein gekoppeltes

35 enzymatisches Reaktionssystem zur Herstellung von

enantiomerenangereicherten organischen Verbindungen aufweisend eine erste enzymatische Transformation eines organischen Substrats unter Verbrauch von NAD(P)H und die Regeneration des NAD(P)H in einer zweiten enzymatischen

5 Transformation durch eine Malatdehydrogenase unter Oxidation von L-Äpfelsäure zu Pyruvat und CO<sub>2</sub>, wobei das entstehende Pyruvat der zweiten enzymatischen Transformation nicht als Substrat in der ersten enzymatischen Transformation eingesetzt wird. Prinzipiell  
10 gelten für dieses Reaktionssystem die gleichen Vorteile und bevorzugten Ausführungsformen, wie sie in Bezug auf das erfindungsgemäße Verfahren schon genannt wurden. Vorteilhaft eingesetzt wird das Reaktionssystem beispielsweise in einem Rührkessel, einer  
15 Rührkesselkaskaden oder in Membranreaktoren, die sowohl im batch-Betrieb als auch kontinuierlich betrieben werden können.

Im Rahmen der Erfindung wird unter Membranreaktor jedwedes Reaktionsgefäß verstanden, bei dem der Katalysator in einem  
20 Reaktor eingeschlossen wird, während niedermolekulare Stoffe dem Reaktor zugeführt werden oder ihn verlassen können. Dabei kann die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert werden oder außerhalb in einem separaten Filtrationsmodul eingebaut sein, bei der die  
25 Reaktionslösung kontinuierlich oder intermittierend durch das Filtrationsmodul strömt und das Retentat in den Reaktor zurückgeführt wird. Geeignete Ausführungsformen sind u.a. in der WO98/22415 und in Wandrey et al. in Jahrbuch 1998, Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI S. 151ff.;  
30 Wandrey et al. in Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds, Vol. 2, VCH 1996, S.832 ff.; Kragl et al., Angew. Chem. 1996, 6, 684f. beschrieben. Die in dieser Apparatur neben der batch und semikontinuierlichen Fahrweise mögliche kontinuierliche  
35 Fahrweise kann dabei wie gewünscht im Cross-Flow-Filtrationsmodus (Fig. 3) oder als Dead-End-Filtration (Fig. 2) durchgeführt werden. Beide Verfahrensvarianten



sind prinzipiell im Stand der Technik beschrieben  
(Engineering Processes for Bioseparations, Ed.: L.R.  
Weatherley, Heinemann, 1994, 135-165; Wandrey et al.,  
Tetrahedron Asymmetry 1999, 10, 923-928).

- 5 Ganzzellkatalysatoren aufweisend ein kloniertes Gen für ein  
erstes Enzym zur Transformation eines organischen Substrats  
und ein kloniertes Gen für eine Malatdehydrogenase, wobei  
diese befähigt sind, in einer ersten enzymatische  
Transformation eine enantiomerenangereicherte organische  
10 Verbindung unter Verbrauch von NAD(P)H herzustellen und die  
Regeneration des NAD(P)H in einer zweiten enzymatischen  
Transformation durch die Malatdehydrogenase unter Oxidation  
von L-Äpfelsäure zu Pyruvat und CO<sub>2</sub> vonstatten gehen zu  
lassen, wobei das entstehende Pyruvat der zweiten  
15 enzymatischen Transformation nicht als Substrat in der  
ersten enzymatischen Transformation eingesetzt wird, sind  
ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.  
Der erfindungsgemäße Ganzzellkatalysator besitzt  
vorzugsweise ein Enzym (Polypeptid) mit Aminosäure- oder  
20 Alkoholdehydrogenaseaktivität und eines mit  
Malatdehydrogenaseaktivität, entstammend insbesondere aus  
den weiter oben genannten Organismen.  
Als Mikroorganismen können im Prinzip alle dem Fachmann für  
diesen Zweck in Frage kommenden Organismen wie z.B. Hefen  
25 wie *Hansenula polymorpha*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces*  
*cerevisiae*, Prokaryonten, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis*  
oder Eukaryonten, wie Säugerzellen, Insektenzellen  
herangezogen werden. Vorzugsweise sind *E. coli*-Stämme für  
diesen Zweck zu benutzen. Ganz besonders bevorzugt sind: *E.*  
30 *coli* XL1 Blue, NM 522, JM101, JM109, JM105, RR1, DH5 $\alpha$ , TOP  
10<sup>-</sup> oder HB101.  
Vorzugsweise wird ein Organismus wie in der DE10155928  
genannt als Wirtsorganismus eingesetzt.  
Der Vorteil eines derartigen Organismus ist die  
35 gleichzeitige Expression beider Polypeptidsysteme, womit  
nur noch ein rec-Organismus für die erfindungsgemäße

Reaktion angezogen werden muss.

Um die Expression der Polypeptide im Hinblick auf ihre Umsetzungsgeschwindigkeiten abzustimmen, können die entsprechenden codierenden Nukleinsäuresequenzen auf

- 5 unterschiedlichen Plasmiden mit unterschiedlichen Kopienzahlen untergebracht und/oder unterschiedlich starke Promotoren für eine unterschiedlich starke Expression der Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Bei derart abgestimmten Enzymsystemen tritt vorteilhafterweise eine
- 10 Akkumulation einer Zwischenverbindung nicht auf und die betrachtete Reaktion kann in einer optimalen Gesamtgeschwindigkeit ablaufen. Dies ist dem Fachmann jedoch hinlänglich bekannt (Gellissen, G.; Piontek, M.; Dahlems, U.; Jenzelewski, V.; Gavagan, J. W.; DiCosimo, R.;
- 15 Anton, D. L.; Janowicz, Z. A. (1996), Recombinant Hansenula polymorpha as a biocatalyst. Coexpression of the spinach glycolate oxidase (GO) and the S. cerevisiae catalase T (CTT1) gene, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 46-54; Farwick, M.; London, M.; Dohmen, J.; Dahlems, U.;
- 20 Gellissen, G.; Strasser, A. W.; DE19920712).

Ganz besonders vorteilhaft ist, das der erfindungsgemäße Ganzzellkatalysator ggf. das bei der erfindungsgemäßen Reaktion entstehende Pyruvat weiter verstoffwechselt, es quasi als Nahrungsquelle verwendet. Derart ausgestaltete

25 Ganzzellkatalysatoren führen dazu, dass das Pyruvat nicht als Nebenprodukt der Reaktion anfällt und somit auch nicht in weiteren Verfahrensschritten vom eigentlich gewünschten chiralen Produkt abgetrennt werden muss.

- Die Herstellung des Ganzzellkatalysators kann im Prinzip
- 30 nach dem Fachmann bekannten Maßnahmen erfolgen (Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Balbas, P. und Bolivar, F. (1990), Design and construction of expression plasmid
- 35 vectors in E.coli, Methods Enzymol. 185, 14-37; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, 205-225,

- Butterworth, Stoneham). Bezüglich der allgemeinen Vorgehensweise (PCR, Klonierung, Expression etc.) sei auch auf folgende Literatur und das dort zitierte verwiesen: Universal GenomeWalker™ Kit User Manual, Clontech, 3/2000
- 5 und dort zitierte Literatur; Triglia T.; Peterson, M. G. und Kemp, D.J. (1988), A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences, Nucleic Acids Res. 16, 8186; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989),
- 10 Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworth, Stoneham.
- 15 Gegenstand der Erfindung sind auch Plasmide aufweisend Genkonstrukte, in denen das Gen für eine Malatdehydrogenase und ein Gen für ein Enzym zur Transformation eines organischen Substrats unter Verbrauch von NAD(P)H vorhanden ist.
- 20 Als Ursprungsplasmide oder -vektoren kommen im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Ausführungsformen in Frage. Derartige Plasmide und Vektoren können z. B. von Studier und Mitarbeiter (Studier, W. F.; Rosenberg A. H.; Dunn J. J.; Dubendroff J. W.; (1990), Use
- 25 of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods Enzymol. 185, 61-89) oder den Broschüren der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech oder Gibco BRL entnommen werden. Weiter bevorzugte Plasmide und Vektoren können gefunden werden in: Glover, D. M. (1985),
- 30 DNA cloning: a practical approach, Vol. I-III, IRL Press Ltd., Oxford; Rodriguez, R.L. und Denhardt, D. T (eds) (1988), Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses, 179-204, Butterworth, Stoneham; Goeddel, D. V. (1990), Systems for heterologous gene expression, Methods
- 35 Enzymol. 185, 3-7; Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: a laboratory

manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Plasmide, mit denen das die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aufweisende Genkonstrukt in ganz bevorzugter Weise in den

- 5 Wirtsorganismus kloniert werden kann, sind: pUC18 (Roche Biochemicals), pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac2 (Roche Biochemicals), pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech), pKK-233-3 (Stratagene) oder pET (Novagen).

Vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang das Plasmid

- 10 pkk/phe/mali (Fig. 5).

Die Darstellung dieses Plasmids und eines entsprechenden rec-Mikroorganismus ist in der Dissertation von S.

Naamnieh, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung S. 70ff beschreiben.

- 15 Für die Anwendung können die betrachteten Polypeptide des erfindungsgemäßen Verfahrens in freier Form als homogen aufgereinigte Verbindungen oder als rekombinant hergestelltes Enzym verwendet werden. Weiterhin können diese Polypeptide auch als Bestandteil eines intakten
- 20 Gastorganismus eingesetzt werden oder in Verbindung mit der aufgeschlossenen und beliebig hoch aufgereinigten Zellmasse des Wirtsorganismus.

Möglich ist ebenfalls die Verwendung der Enzyme in immobilisierter Form (Sharma B. P.; Bailey L. F. und

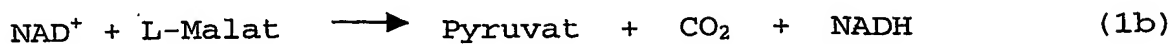
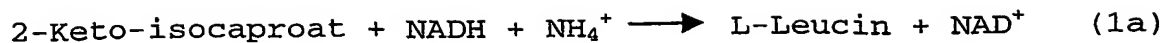
- 25 Messing R. A. (1982), Immobilisierte Biomaterialien - Techniken und Anwendungen, Angew. Chem. 94, 836-852).

Vorteilhafterweise erfolgt die Immobilisierung durch Lyophilisation (Paradkar, V. M.; Dordick, J. S. (1994), Aqueous-Like Activity of  $\alpha$ -Chymotrypsin Dissolved in

- 30 Nearly Anhydrous Organic Solvents, J. Am. Chem. Soc. 116, 5009-5010; Mori, T.; Okahata, Y. (1997), A variety of lipi-coated glycoside hydrolases as effective glycosyl transfer catalysts in homogeneous organic solvents, Tetrahedron Lett. 38, 1971-1974; Otamiri, M.; Adlercreutz, P.;

- 35 Matthiasson, B. (1992), Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize

- the enzyme in active form in toluene, Biocatalysis 6, 291-305). Ganz besonders bevorzugt ist die Lyophilisation in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen, wie Aerosol OT oder Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol (PEG) oder Brij 52 (Diethylenglycol-mono-cetylether) (Kamiya, N.; Okazaki, S.-Y.; Goto, M. (1997), Surfactant-horseradish peroxidase complex catalytically active in anhydrous benzene, Biotechnol. Tech. 11, 375-378).
- Äußerst bevorzugt ist die Immobilisierung an Eupergit<sup>®</sup>, insbesondere Eupergit C<sup>®</sup> und Eupergit 250L<sup>®</sup> (Röhm) (Eupergit.RTM. C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. Katchalski-Katzir, E.; Kraemer, D. M. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (2000), 10(1-3), 157-176).
- Gleichfalls bevorzugt ist die Immobilisierung an Ni-NTA in Kombination mit dem His-Tag (Hexa-Histidin) ergänzten Polypeptid (Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Bornhorst, Joshua A.; Falke, Joseph J. Methods in Enzymology (2000), 326, 245-254).
- Die Verwendung als CLECs ist ebenfalls denkbar (St. Clair, N.; Wang, Y.-F.; Margolin, A. L. (2000), Cofactor-bound cross-linked enzyme crystals (CLEC) of alcohol dehydrogenase, Angew. Chem. Int. Ed. 39, 380-383).
- Durch diese Maßnahmen kann es gelingen aus Polypeptiden, welche durch organische Solventien instabil werden, solche zu generieren, die in Gemischen von wässrigen und organischen Lösungsmitteln bzw. ganz in Organik arbeiten können.
- Das erfindungsgemäße Verfahren kann so ausgeführt werden, dass die MDH aus *E. coli* mit einer NAD-abhängigen Leucindehydrogenase (LeuDH aus *Bacillus cereus*; Sigma) gekoppelt wird. LeuDH katalysiert unter NADH-Verbrauch die reduktive Aminierung von aliphatischen Ketosäuren wie beispielsweise Ketoisocaproat zu den entsprechenden L-Aminosäuren wie L-Leucin (Gleichung (1)).



Der Reaktionsverlauf wurde per HPLC verfolgt. Das Ergebnis kann folgender Tabelle 1 im Vergleich zu einem äquivalenten

5 Umsatz mit FDH statt MDH entnommen werden.

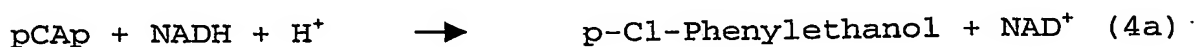
Tabelle 1: Vergleich der Bildung von L-Leucin (HPLC) im gekoppelten Ansatz mit Coenzym-Regenerierung durch MDH und FDH. Eingesetzt wurden jeweils 10 mM Ketoisocaproat und für die Regenerierung durch Malatdehydrogenase (MDH) 100 mM L-Malat bzw. durch Formiatdehydrogenase (FDH) 100 mM Formiat.

Zeit [min]	L-Leucin mit MDH [mM]	L-Leucin mit FDH [mM]
0	0,7	0,1
10	8,8	9,9
30	9,6	11,1
60	10,8	9,8
120	9,9	9,9

Ebenfalls untersucht wurde der Einsatz von Alkoholdehydrogenasen in Kombination mit

15 Malatdehydrogenasen. Die MDH aus *E. coli* wird mit einer NAD-abhängigen S-spezifischen Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* (RE-ADH; DE10218689) gekoppelt. Die Verwendbarkeit der MDH wird dabei über die Reduktion eines Ketons (p-Cl-Acetophenon = pCap) entsprechend

20 Gleichung (4) geprüft.



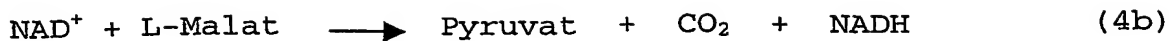


Tabelle 2: Abnahme des Ketons p-Cl-Acetophenon (10 mM eingesetzt) und Zunahme des enzymatisch gebildeten Alkohols p-Cl-Phenylethanol (100 % entspr. 10 mM) in Abhängigkeit von der Zeit.

Zeit [min]	Keton [%]	Alkohol [%]
0	100	0
10	28	72
20	12	88
30	4	96
60	0	100

Enantiomerenangereichert oder enantiomer angereichert bezeichnet die Tatsache, dass eine optische Antipode im Gemisch mit ihrer anderen zu >50% vorhanden ist.

- 10 Die dargestellten Strukturen beziehen sich bei Vorliegen eines Stereozentrums auf beide möglichen Enantiomere und bei Vorliegen von mehr als einem Stereozentrum im Molekül auf alle möglichen Diastereomere und bezüglich eines Diastereomers auf die darunter fallenden möglichen zwei
- 15 Enantiomere der in Frage stehenden Verbindung.

Der Organismus *Candida boidinii* ist unter der Nummer ATCC 32195 bei der American Type Culture Collection hinterlegt und öffentlich zugänglich.

- 20 Die in dieser Schrift genannten Dokumente des Standes der Technik gelten als von der Offenbarung mitumfasst.

## Beschreibungen der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt einen Membranreaktor mit Dead-End-Filtration. Das Substrat 1 wird über eine Pumpe 2 in den Reaktorraum 3 überführt, der eine Membran 5 aufweist. Im  
5 rührerbetriebenen Reaktorraum befinden sich neben dem Lösungsmittel der Katalysator 4, das Produkt 6 und nicht umgesetztes Substrat 1. Über die Membran 5 wird hauptsächlich niedermolekulares 6 abfiltriert.

Fig. 2 zeigt einen Membranreaktor mit Cross-Flow-  
10 Filtration. Das Substrat 7 wird hier über die Pumpe 8 in den gerührten Reaktorraum überführt, in dem sich auch Lösungsmittel, Katalysator 9 und Produkt 14 befindet. Über die Pumpe 16 wird ein Lösungsmittelfluß eingestellt, der über einen ggf. vorhandenen Wärmetauscher 12 in die Cross-  
15 Flow-Filtrationszelle 15 führt. Hier wird das niedermolekulare Produkt 14 über die Membran 13 abgetrennt. Hochmolekularer Katalysator 9 wird anschließend mit dem Lösungsmittelfluß ggf. wieder über einen Wärmetauscher 12 ggf. über das Ventil 11 zurück in den Reaktor 10 geleitet.



## Beispiel 1:

Zur Gewinnung der hier benutzten MDH aus *E. coli* K12 s. Dissertation S. Naamnieh, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung S. 70ff.

5    Reinigung und biochemische Eigenschaften der MDH aus *E. coli*:

a) Reinigung

Die Reinigung der recMDH aus *E. coli*-Rohextrakten (Expressionsstamm: *E. coli*-Derivat JM105) erfolgte in  
10    Anlehnung an das Reinigungsprotokoll (Stols L., and Donnelly M. I. (1997). Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2695-701.). Zunächst wurden die rec-Bakterienzellen durch  
15    Desintegration mit Glasperlen aufgeschlossen (Aufschlusspuffer Tris/HCl 100mM pH 7.5). Im Anschluss daran erfolgte ein Reinigungsschritt durch eine Q-Sephadex. Nach der Reinigung mittels Q-Sephadex konnte eine spezifische Aktivität der MDH von etwa 7,3 U/mg  
20    bestimmt werden. Durch die Aufreinigung dieses Enzymes mittels weiterer chromatographischer Schritte, Hydroxyapatit und Phenylsephadex konnte die MDH bis zur Homogenität mit einer spezifischen Aktivität von 133 U/mg gereinigt werden.

Tab. 3: Zusammenfassung der Reinigung der rec-MDH aus *E. coli*.

Reinigungs- schritt	Aktivi- tät (U)	Protein (mg)	Spez. Akt. (U/mg)	Anreicherung (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	210	202	1,03		100
Q-Sepharose	184	25,2	7,3	7,1	88
Hydroxyapatit	68	1,6	42,5	41	32
Phenyl- sepharose	24	0,18	133	129	11

#### b) Biochemische Charakterisierung

##### 5 - Km-Werte

Für L-Malat wurde ein Km-Wert von 0,29 mM gemessen und für das Coenzym NAD<sup>+</sup> ein Km-Wert von 0,14 mM.

Beide Km-Werte liegen in einem niedrigen Bereich von < 1 mM, sie zeigen, dass beide Substrate mit guter Affinität vom Enzym erkannt werden. Beide Werte sprechen dafür, dass die MDH für die Regenerierung von NADH verwendet werden kann.

##### - pH-Optimum (Fig. 1)

MDH zeigt maximale Aktivität bei höheren pH-Werten von 11 und höher. Allerdings ist der Aktivitätsabfall zu niedrigeren pH-Werten relativ gering, so liegen bei pH 8,0 noch 72% und bei pH 7,0 noch 67% Aktivität vor.

##### - Temperaturoptimum

Das Temperaturoptimum der MDH liegt bei ca. 55°C (Fig. 4).

## Beispiel 2:

## a) Kopplung von Leucin-Dehydrogenase mit Malat-Dehydrogenase

Die MDH aus *E. coli* wird mit einer NAD-abhängigen Leucin-Dehydrogenase (LeuDH aus *Bacillus cereus*; Sigma) gekoppelt. LeuDH katalysiert unter NADH-Verbrauch die reduktive Aminierung von aliphatischen Ketosäuren wie beispielsweise Ketoisocaproat zu den entsprechenden L-Aminosäuren wie L-Leucin.

10 Testansatz (1 ml gesamt; wenn nicht anders angegeben ist in Klammern die Konzentration der Stammlösung angegeben):

526 µl Hepes-Puffer (200 mM Hepes, pH 8,5 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>);  
143 µl Ammoniumsulfat-Lösung (500 mM im Test); 100 µl  
Ketoisocaproat (100 mM); 20 µl NAD<sup>+</sup> (50 mM); 200 µl L-Malat  
15 (500 mM, Na-salz, in Hepes-Puffer gelöst, pH 8,5); 1 µl  
LeuDH (0,5 U im Test); 10 µl MDH (1,5 U im Test; partiell  
gereinigt).

Der Testansatz wird bei 30°C inkubiert, nach 0, 10, 30, 60  
und 120 min werden Proben (50 µl; Eppendorf-  
20 Reaktionsgefäße) entnommen und zum Abstoppen der Reaktion  
für 3 min bei 95°C erhitzt. Denaturiertes Protein wird  
durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm (Eppendorf-  
Tischzentrifuge) abgetrennt und der Überstand nach  
Derivatisierung mit ortho-Phthalaldehyd (OPA) mittels HPLC  
25 analysiert.

Derivatisierung mit OPA (= ortho-Phthaldialdehyd):

140 µl Na-Borat-Puffer (100 mM; pH 10,4); 40 µl Probe bzw.  
Standard; 20 µl OPA/IBLC-Reagenz (= ortho-Phthaldialdehyd /  
N-Isobutyryl-L-cystein). Von dieser Reaktionslösung werden  
30 20 µl für die HPLC-Analyse injiziert.

HPLC-Analyse:

Ergebnisse s. Tabelle 1:

- 5 b) Vergleichsversuch: Kopplung von Leucin-Dehydrogenase mit Formiat-Dehydrogenase

10 In einem parallel durchgeführten Vergleichsansatz wurden dieselben Komponenten wie oben beschrieben verwendet, aber an Stelle der Malat-Dehydrogenase wurden 0,5 U Formiat-Dehydrogenase (FDH aus *Candida boidinii*; Sigma) eingesetzt und als Regenerierungssubstrat an Stelle von 100 mM L-Malat 100 mM Formiat.

Ergebnisse s. Tabelle 1.

Beispiel 3: Kopplung der MDH mit Alkohol-Dehydrogenase:

- 15 Die MDH aus *E. coli* (Expressionsstamm: *E. coli*-Derivat JM 105) wird mit einer NAD-abhängigen S-spezifischen Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* (RE-ADH) gekoppelt. Die Verwendbarkeit der MDH wird dabei über die Reduktion eines Ketons (p-Cl-Acetophenon) geprüft.

- 20 Testansatz (1 ml gesamt; wenn nicht anders angegeben ist in Klammern die Konzentration der Stammlösung angegeben):

678,7 µl Hepes-Puffer (100 mM Hepes, pH 8,5 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>); 1,3 µl p-Cl-Acetophenon (10 mM im Test); 20 µl NAD<sup>+</sup> (50 mM); 200 µl L-Malat (500 mM, Na-salz, in Hepes-Puffer gelöst, pH 8,5); 15 µl RE-ADH (1 U im Test); 85 µl MDH (1 U im Test; partiell gereinigt).

Der Testansatz wird bei 30°C inkubiert, nach 0, 10, 20, 30 und 60 min werden Proben (50 µl) entnommen, mit 100 µl Ethylacetat versetzt und die Oberphase mittels

Gaschromatographie auf Bildung des Alkohols p-Cl-Phenylethanol hin analysiert.

Ergebnisse s. Tabelle 2.

#### 5 Beispiel 4: Konstruktion eines Expressionsvektors mit heterologer Expression

Aus der Sequenz des amplifizierten Fragmentes wurden Primer mit integrierten Restriktionsschnittstellen und ein Codon für die ribosomale Bindungsstelle konstruiert. Nach der Amplifikation des Malatdehydrogenases aus dem rekombinanten pUC18 wurde das PCR-Fragment in den rekombinanten recPhe-pKK-223-3-Expressionsvektor hinter der PheDH-Sequenz an der PstI und HindIII-Restriktionsschnittstellen kloniert (Fig. 8 - Konstruktion des Plasmids für eine heterologe Expression zur L-Phe Synthese mittels Ganzzellumsetzung).

PCR:

5'-Forward: N'-Malic-pst

5' CTGCAGAGCCCAGGGATGGATATTCAAAAA 3'

Konzentration 100 pmol/ $\mu$ l

20 5'-Reverse: C'-Malic-Hin

5' AAGCTTTTAGATGGAGGTACGGCGGTAGTC 3'

Konzentration 100 pmol/ $\mu$ l

Tabelle 4: PCR Protokoll zur Amplifizierung des Malatdehydrogenases aus dem rekombinanten pUC18-Plasmid.

25 Variiert wurden die Konzentrationen der Template-DNA.

Template DANN recpUC18	N'-Malic- pst Prim 1	C'-Malic- Hin Prim 2	dNTP	Puffer	Taq- Polymerase	H <sub>2</sub> O
50ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1 $\mu$ l	83 $\mu$ l

25ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1 $\mu$ l	83 $\mu$ l
10ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1 $\mu$ l	83 $\mu$ l

Ein Zyklus besteht aus:

Denaturierungsschritt : 94°C

Annealingschritt: 59°C

5 Amplifizierungsschritt: 72°C

#### Klonierung:

Das neue Konstrukt des rekombinanten Plasmids (Fig. 5) wurde in kompetente *E. coli*-Zellen JM 105 bzw. HB 101 transformiert.

Die Standardtransformation wurde nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80.) durchgeführt. Hierzu wurden 100-200  $\mu$ l kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 40 ng DNA aus dem Ligationsansatz zugegeben. Die Plasmidzellsuspension wurde 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 90 sec auf 42°C erwärmt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 300  $\mu$ l LB - Medium wurden die Zellen zur Regeneration etwa 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l dieser Kultur auf einer Antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit der Klonierung der Malatdehydrogenase 3' zur PheDH an der PstI- und HindIII-Schnittstelle mit eigener ribosomalen Bindungsstelle konnte eine Expression beider Enzyme gleichzeitig erfolgen.

Anmerkung: Weitere Detailinformationen zur experimentellen Herstellung dieser Zellen werden beschrieben sein in: S.

Naamnieh, *Dissertation*, Universität Düsseldorf, in Vorbereitung.

## 5 Beispiel 5: Coexpression der PheDH und der Malatdehydrogenase

10 Von den positiven Klonen wurden einige zur Expression ausgewählt. Eine Einzelkolonie der jeweiligen Klone wurde in 5 ml LB<sub>amp</sub> -Medium überimpft, und nach Erreichen von OD<sub>580</sub> = 0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktion erfolgte über Nacht und die geernteten Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen.

15 Der rekombinante Stamm HB101 zeigt eine Malatdehydrogenase-Aktivität von 100 U/ml und ebenso eine PheDH -Aktivität von 130 U/ml. Die Aktivität beider Enzyme im rekombinanten Stamm JM 105 ist eindeutig höher und liegt bei ~ 600 U/ml für Malatdehydrogenase und ~1200 U/ml für die PheDH.

Die beiden rekombinanten Stämme wurden im 10 L Fermenter kultiviert und die Aktivität beider Enzyme bestimmt.

20 Tabelle 5: Aktivitätsbestimmung der exprimierten Enzyme in einem 10 L Fermenter mit LB-Medium als batch-Fermentation.

	Aktivität PheDH		Aktivität Malatdehydrogenase	
	(U/ml)	(U/mg)	(U/ml)	(U/mg)
E. coli HB101	400	33	220	22
E. coli JM105	1300	118	640	71

Aus den Daten der Expression ist zu entnehmen, dass der *E. coli* Stamm JM 105 deutlich bessere Aktivität für beide Enzyme zeigt, daher wurden alle weiteren Versuche mit diesem Stamm durchgeführt.

5

#### Beispiel 6: Optimierung der Aktivität

Um die maximale Aktivität der erhaltenen Rohextrakte ausschöpfen zu können, wurden mehrere Parameter untersucht und variiert.

10 Beide heterolog exprimierten Enzyme zeigen bei unterschiedlichen Bedingungen beste Stabilitätseigenschaften. Von Interesse war es, die optimalen Eigenschaften für beide Enzyme im gleichen System zu ermitteln. Die nachfolgenden Versuche wurden mit Blick  
15 auf diese Tatsache durchgeführt.

##### a) Optimierung des Aufschlusspuffer

1 g Zellen JM<sub>105</sub> wurde in 0,1 M Tris- bzw. 0,1 M Kpi-Puffer mit/ohne BSA (1,5 g/l) 30 %ig aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte mit Ultraschall bei 70 cont. Cycles.  
20 Zusätzlich zu den Puffern wurden 1,5 g/l BSA zur Stabilisierung der Enzyme zugegeben.

Tabelle 6: Aktivitätsvergleich in Abhängigkeit des Aufschlusspuffers

	0,1M Tris		0,1M Kpi	
	- BSA	+ BSA	- BSA	+ BSA
PheDH	520 U/ml	610 U/ml	730 U/ml	1100 U/ml
Malatdehydrogenase	430 U/ml	720 U/ml	320 U/ml	610 U/ml



Der Zusatz an BSA führte in beiden Fällen zu einer Steigerung der Aktivität. Ebenso beeinflusste der Aufschluß-Puffer die Aktivitäten. Hierbei war zu beobachten, dass der geeignete Aufschluß-Puffer für die einzelnen Enzyme verschieden war. Der Kpi-Puffer war für die PheDH besser geeignet als für das Malatdehydrogenase, da aber die Aktivitätsabnahme des Malatdehydrogenases im Kpi-Puffer relativ gering war, wurden die rekombinanten Zellen nach der heterologen Expression weiterhin in diesem Puffer aufgeschlossen.

b) Aufschlussdauer zur Untersuchung der Stabilität

Ebenso wurde die Aufschlussdauer überprüft und der kritische Punkt zur Stabilität der Enzyme während dieses Vorganges bestimmt. Aus den Daten ist die optimale Aufschlussdauer zu entnehmen (Fig. 9 - Stabilitätsbestimmung der PheDH bzw. des Malatdehydrogenases nach verschiedenen Aufschlusszeiten mittels Ultraschalls. Die Zellen wurden nach einer 60-, 30-sekundigen Behandlung zwischenzeitlich 30 Sekunden abgekühlt).

Für diesen Versuch wurde folgende Suspension verwendet:

1 g rekombinante Zellen (JM105)  
3 ml Kpi-Puffer 0,1 M

Bei längerer Behandlung der Zellen mit Ultraschall nimmt die Aktivität der PheDH drastisch ab, wogegen die Aktivität der Malatdehydrogenase erhalten bleibt. Die idealen Aufschlussbedingungen für einen 25 %igen Aufschluß von 1 g rekombinantem *E. coli* JM105 sind daher 4 x 30 s Ultraschallbehandlung mit zwischenzeitlich 3 x 30s Abkühlung im Eisbad.

Bei längeren Behandlungen mit Ultraschall wird die Probe erhitzt, was zu einer Denaturierung der Enzyme führen kann. Die Proteinmenge wurde bei diesem Versuch bestimmt und ist aus nachfolgender zu entnehmen.

- 5 Tabelle 7: Proteinbestimmung beider exprimierter Enzyme, PheDH und Malatdehydrogenase, nach Variation der Aufschlusszeit. Die Zellen wurden nach einer 60-, 30-sekundigen Behandlung zwischenzeitlich 30 Sekunden abgekühlt.

	60sec x 2 Spez. Aktivität: U/mg	30sec x 4 Spez. Aktivität: U/mg	30sec x 8 Spez. Aktivität: U/mg
PheDH	30	105	16
Malatdehydrogenase	20	90	110

10

Bei einer Reinigung des Malatdehydrogenases bis zur Homogenität konnte eine spezifische Aktivität von 466 U/mg erreicht werden. Die Reinigungsschritte sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

- 15 Tabelle 8: Aufreinigung der rekombinanten Malatdehydrogenase

	Volumen (ml)	Aktivität (U)	Protein (mg)	Spez. Aktivität (u/mg)	Ausbeute (%)	Faktor
Ultrasentrifugation	0.6	820	13	63	100	1
Hydroxyapatit	9	470	5	94	57	1.49

Q-Sepharose	7	496	2.1	236	60	3.74
Phenylsepharose	1.9	280	0.6	466	34	7.39

c)  $K_M$ -Wertbestimmung

Für das Substrat und das Coenzym der Malatdehydrogenase wurden die  $K_M$ -Werte bestimmt. Die  $K_M$ -Werte wurden an  
 5 homogenen oder partiell gereinigten rec-Malatdehydrogenase Proben bestimmt.

L-Malat: 0,29 mM

NAD<sup>+</sup> 0,14 mM

# 10 Beispiel 7: Gekoppelte L-Phenylalanin Synthese unter Regeneration des Coenzym NADH

Wichtige Faktoren für eine gekoppelte Reaktion sind das pH-Optimum sowie die Temperaturstabilität der beiden Enzyme. Zusätzlich zu der Stabilität der Enzyme spielen weitere  
 15 Faktoren wie z.B. der Einfluss der verschiedenen Substrate auf die Enzyme eine Rolle.

In Bezug auf das pH-Optimum wurde eine Kinetik durchgeführt und die pH-Abhängigkeit der Synthese bestimmt. In Fig. 10 ist die Zunahme der Aktivität bei steigendem pH-Wert zu  
 20 entnehmen, wobei für die Synthese aus Gründen der Coenzymstabilität ein pH-Wert von 8.0 ausgewählt wurde, in dem beide Enzyme zwar nicht die höchste Aktivität zeigen, aber bei dem das Coenzym stabil bleibt (Fig. 10 - pH-Optimum von Malatdehydrogenase und der PheDH. Die Aktivität  
 25 beider Enzyme nimmt bei Zunahme des pH-Wertes zu. Die Messungen wurden mit partiell gereinigtem Enzym durchgeführt. Für die Phenylalanin Dehydrogenase wurde die reduktive Aminierung gemessen).

Ein zweiter Faktor für die gekoppelte Enzymreaktion ist die geeignete Temperatur, bei der beide Enzyme für längere Zeit stabil erhalten bleiben. Daher wurde ein weiterer Versuch zur Bestimmung des Temperaturoptimums durchgeführt (Fig. 11 - Temperaturoptimum. Die Messungen wurden bei pH 8,5 und in 0,1M HEPES-Puffer durchgeführt).

Wie aus Fig. 11 zu entnehmen ist, liegt das Temperaturoptimum beider Enzyme bei 50°C. Bei 30°C beträgt die gemessene Aktivität nur 60 %.

- 10 Das Malatdehydrogenase ist für längere Zeit bei 45°C stabil. Da die PheDH aber bei diesem Temperaturwert instabil wird, wurden die Synthesen bei 30°C durchgeführt, damit die Stabilität beider Enzyme sowie des Coenzym über längere Zeit gewährleistet werden konnte.
- 15 Enzyme erreichen ihre optimale Aktivität im jeweils geeigneten Puffer. Beide Enzyme wurden mit zwei verschiedenen Puffern in je einem Reaktionsansatz getestet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der PheDH- bzw. der

- 20 Malatdehydrogenase-Aktivität in verschiedenen Reaktionspuffern. Die Aktivitäten sind in Prozent vom Optimalen zu sehen.

	0,1M HEPES-Puffer (pH 8.0)	0,1M Tris-Puffer (pH 8.0)
PheDH	84 %	100 %
MDH	100 %	42 %

- 25 Da die Aktivität der PheDH in HEPES-Puffer nicht erheblich abnimmt, wurde die gekoppelte Enzymreaktion in diesem Puffer durchgeführt.

Mit der Bestimmung der Puffer-, pH- und Temperatur-Werte konnten geeignete Bedingungen und Medien für die Synthese von Phenylalanin durch eine gekoppelte Enzymreaktion mit Regeneration des Cofaktors (NADH) ausgewählt werden.

- 5   Eingesetzt wurden 30 mM Phenylpyruvat, 100 mM Ammoniumsulfat, 100 mM HEPES-Puffer, 70 mM L-Malat, 2 mM NAD<sup>+</sup>, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 25U PheDH (partiell gereinigt) und 30U Malatdehydrogenase. Die Proben werden mittels HPLC analysiert.
- 10 Die Synthese wurde über mehrere Stunden verfolgt. Nach 4 h waren ca. 50 % des eingesetzten Substrates Phenylpyruvat zu L-Phenylalanin umgesetzt (Fig. 12 - Bildungskinetik für L-Phe. Die Bildung von L-Phe wurde *in situ* durchgeführt).

15   Beispiel 8: Ganzzellumsetzung

Als Standard- Ansatz für die Ganzzellumsetzung wurde folgendes Medium verwendet:

0.1 M	HEPES-Puffer (pH 8.0)
40 mM	Phenylpyruvat
20   0.1 M	L-Malat
0.1 M	Ammoniumsulfat
2 mM	MgCl <sub>2</sub>

- Die Umsetzung erfolgte bei 30°C und mit 1g rekombinanten *E.coli*-Zellen. Das gebildete Phenylalanin wurde mittels
- 25 HPLC nachgewiesen (Fig. 6).

Die Bildung von L-Phe durch rekombinante *E.coli* -Zellen wurde über 20 h verfolgt und die Ausbeute bestimmt (Fig. 7).

- Eine Metabolisierung des entstandenen Produktes L-Phe
- 30 konnte nach 20h Inkubation nicht nachgewiesen werden.

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten organischen Verbindungen in einem gekoppelten enzymatischen Reaktionssystem  
5 aufweisend eine erste enzymatische Transformation eines organischen Substrats unter Verbrauch von NAD(P)H und die Regeneration des NAD(P)H in einer zweiten enzymatischen Transformation durch eine Malatdehydrogenase unter Oxidation von L-Äpfelsäure zu  
10 Pyruvat und CO<sub>2</sub>,  
dadurch gekennzeichnet, dass das entstehende Pyruvat der zweiten enzymatischen Transformation nicht als Substrat in der ersten enzymatischen Transformation eingesetzt wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass die erste enzymatische Transformation unter Verwendung einer Alkoholdehydrogenase oder Aminosäuredehydrogenase abläuft.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass als Alkoholdehydrogenase eine ADH aus *Lactobacillus kefir* oder *Rhodococcus erythropolis* und als Aminosäuredehydrogenase eine Leucindehydrogenasen bzw.  
25 Phenylalanindehydrogenasen verwendet wird.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass eine Malatdehydrogenase aus *E. coli*, insbesondere *E.*  
30 *coli* K12 verwendet wird.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass

die Reaktion in einem wässrigen ein- oder mehrphasigen Lösungsmittelgemisch durchgeführt wird.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur während der Reaktion zwischen 20 und 40°C liegt.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
10 dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert während der Reaktion zwischen 6 und 9 liegt.
8. Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem zur Herstellung von enantiomerenangereicherten organischen  
15 Verbindungen aufweisend eine erste enzymatische Transformation eines organischen Substrats unter Verbrauch von NAD(P)H und die Regeneration des NAD(P)H in einer zweiten enzymatischen Transformation durch eine Malatdehydrogenase unter Oxidation von L-  
20 Äpfelsäure zu Pyruvat und CO<sub>2</sub>,  
dadurch gekennzeichnet, dass das entstehende Pyruvat der zweiten enzymatischen Transformation nicht als Substrat in der ersten enzymatischen Transformation eingesetzt wird.
- 25 9. Ganzzellkatalysator aufweisend ein kloniertes Gen für ein erstes Enzym zur Transformation eines organischen Substrats und ein kloniertes Gen für eine Malatdehydrogenase, wobei dieser befähigt ist, in einer ersten enzymatische Transformation eine  
30 enantiomerenangereicherte organische Verbindung unter Verbrauch von NAD(P)H herzustellen und die Regeneration des NAD(P)H in einer zweiten enzymatischen Transformation durch die Malatdehydrogenase unter Oxidation von L-Äpfelsäure zu

Pyruvat und  $\text{CO}_2$  vonstatten geht, wobei das entstehende Pyruvat der zweiten enzymatischen Transformation nicht als Substrat in der ersten enzymatischen Transformation eingesetzt wird.

- 5 10. Plasmide aufweisend Genkonstrukte, in denen das Gen für eine Malatdehydrogenase und ein Gen für ein Enzym zur Transformation eines organischen Substrats unter Verbrauch von  $\text{NAD(P)H}$  vorhanden ist.



## Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung enantiomerenangereicherter organischer Verbindungen gerichtet. Insbesondere betrifft die

5 vorliegende Erfindung ein enzymatisch arbeitendes Verfahren, bei dem in einem gekoppelten enzymatischen Reaktionssystem NAD(P)H zur Herstellung der organischen Verbindung von einem Enzym verbraucht und das NAD(P)H gleichzeitig durch ein zweites Enzymsystem regeneriert  
10 wird.

Ebenfalls vorgeschlagen wird ein derart erfindungsgemäß arbeitendes Reaktionssystem sowie ein vorteilhafter Ganzzellkatalysator.

Fig. 1:

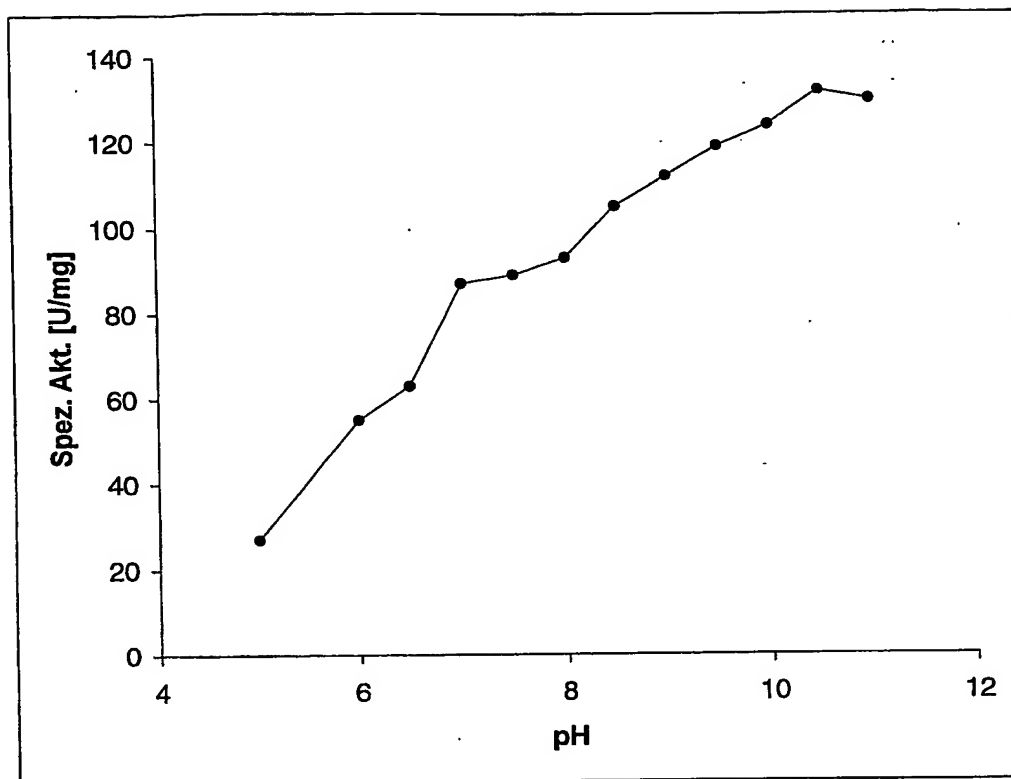


Fig 2:

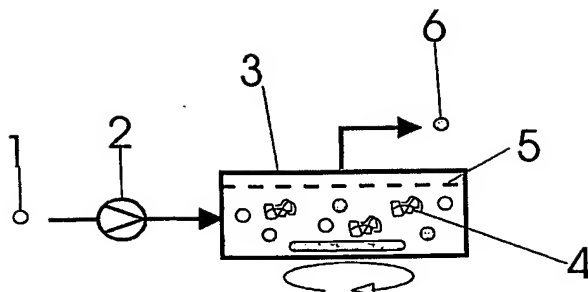


Fig. 3:

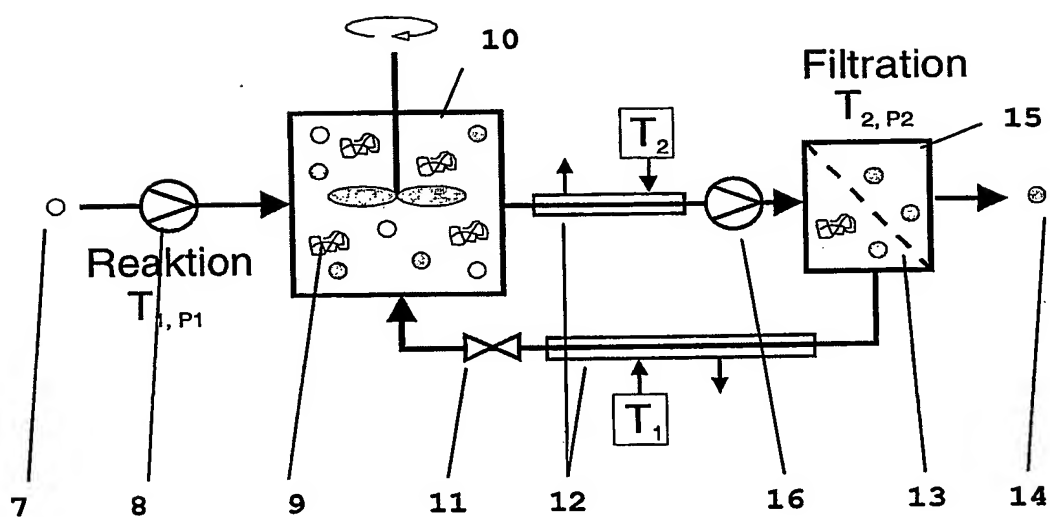


Fig. 4:

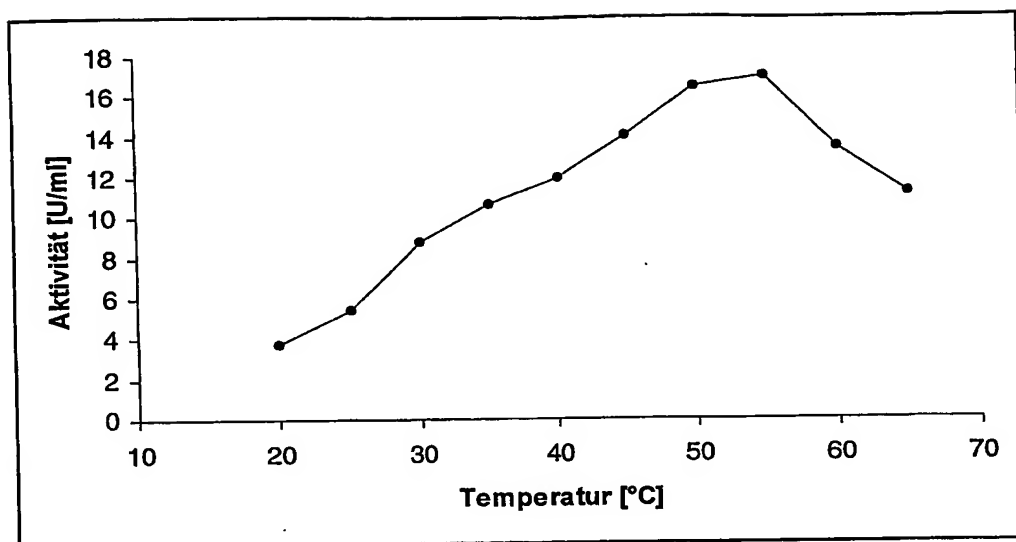


Fig. 5:

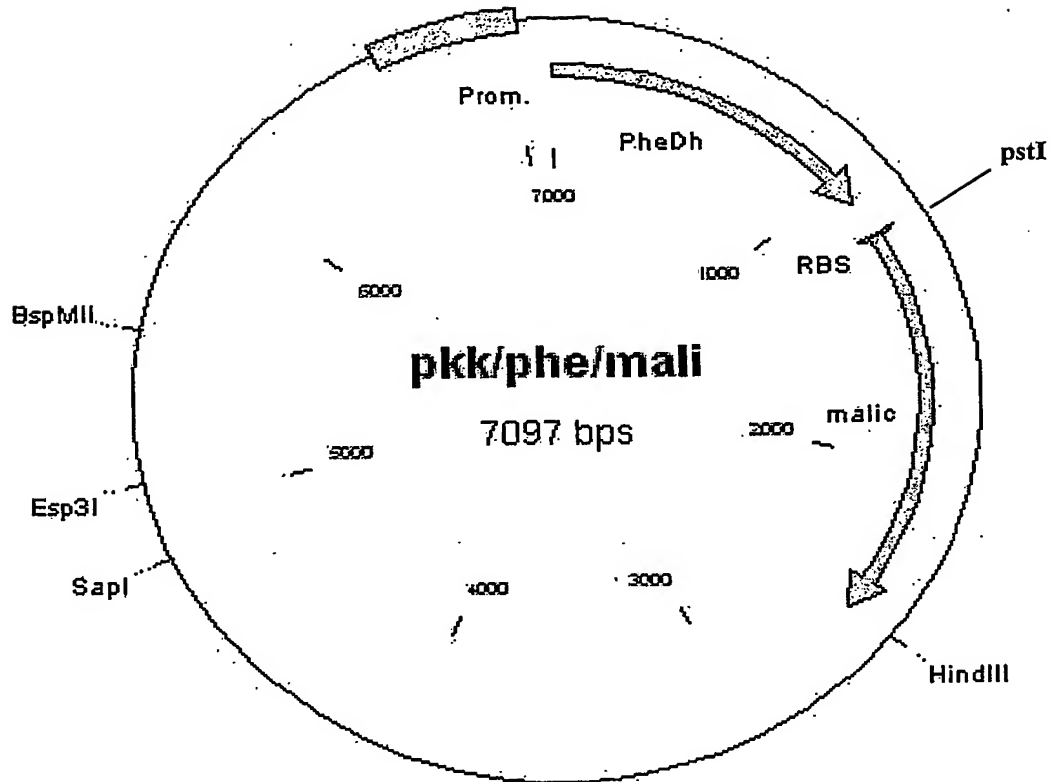


Fig. 6:

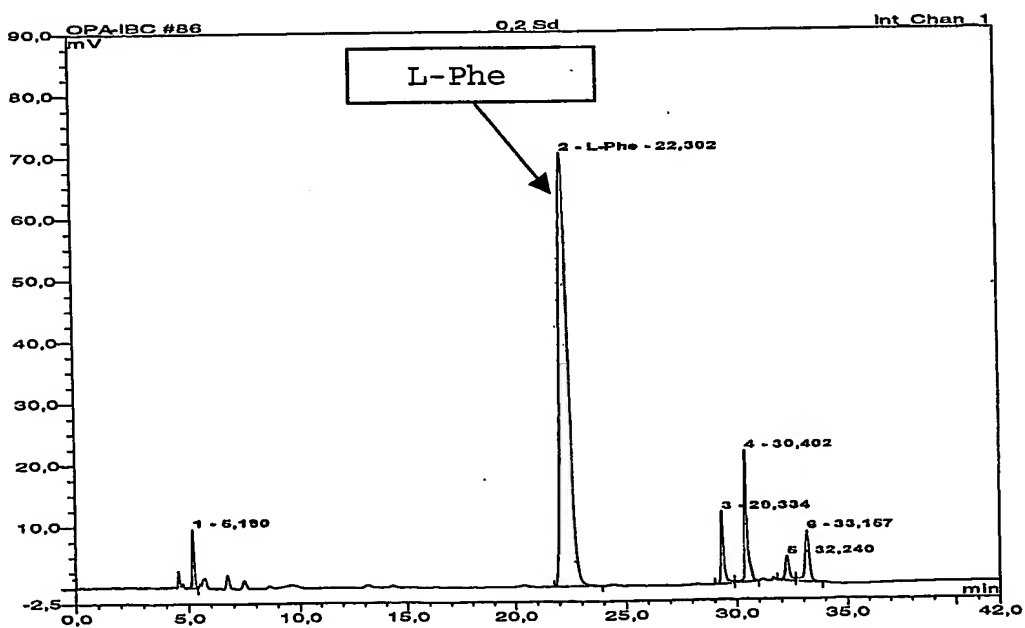


Fig. 7:

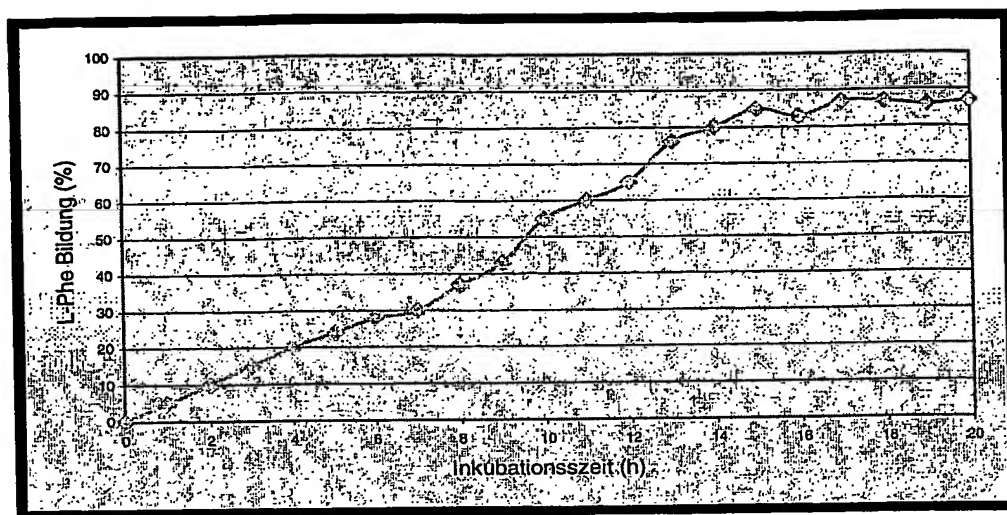


Fig. 8:

5

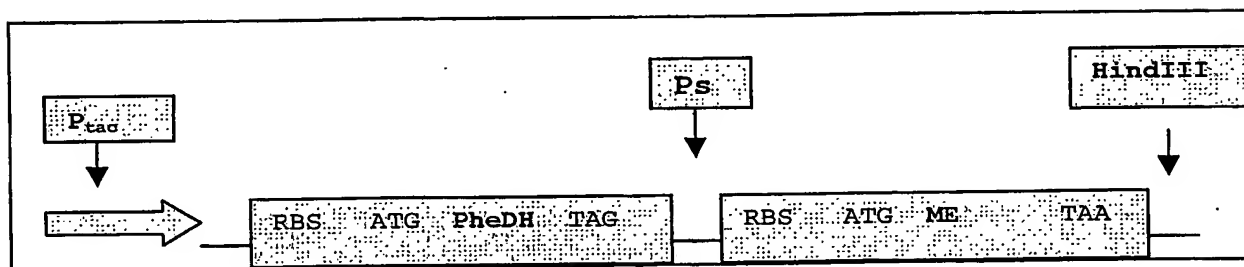


Fig. 9:

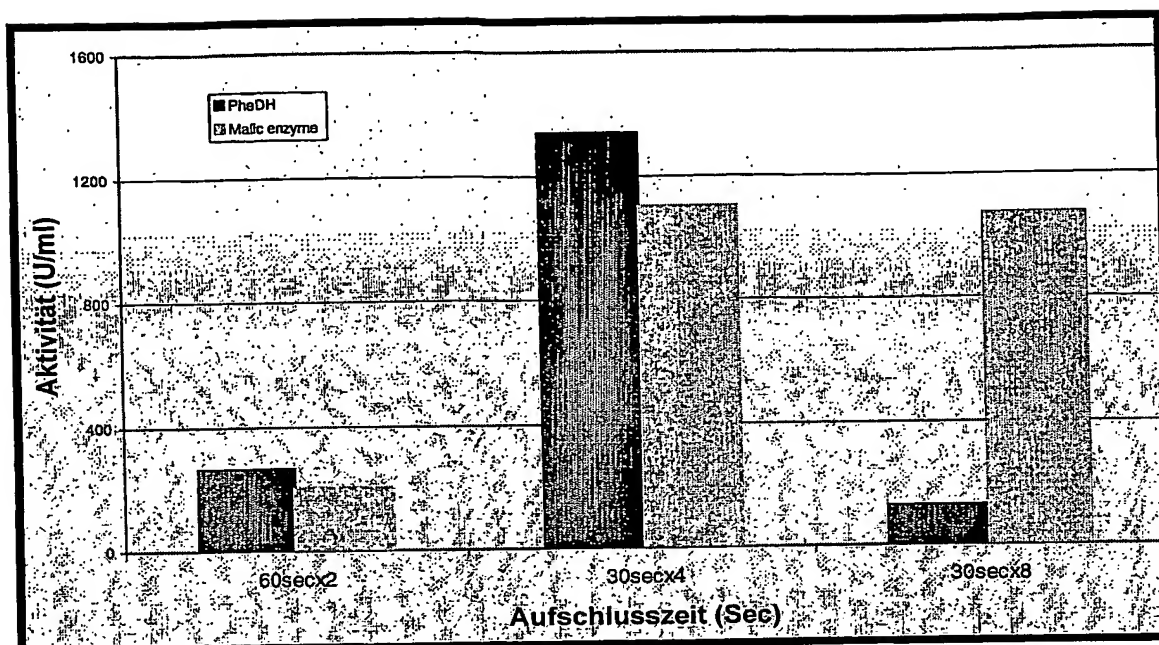


Fig. 10

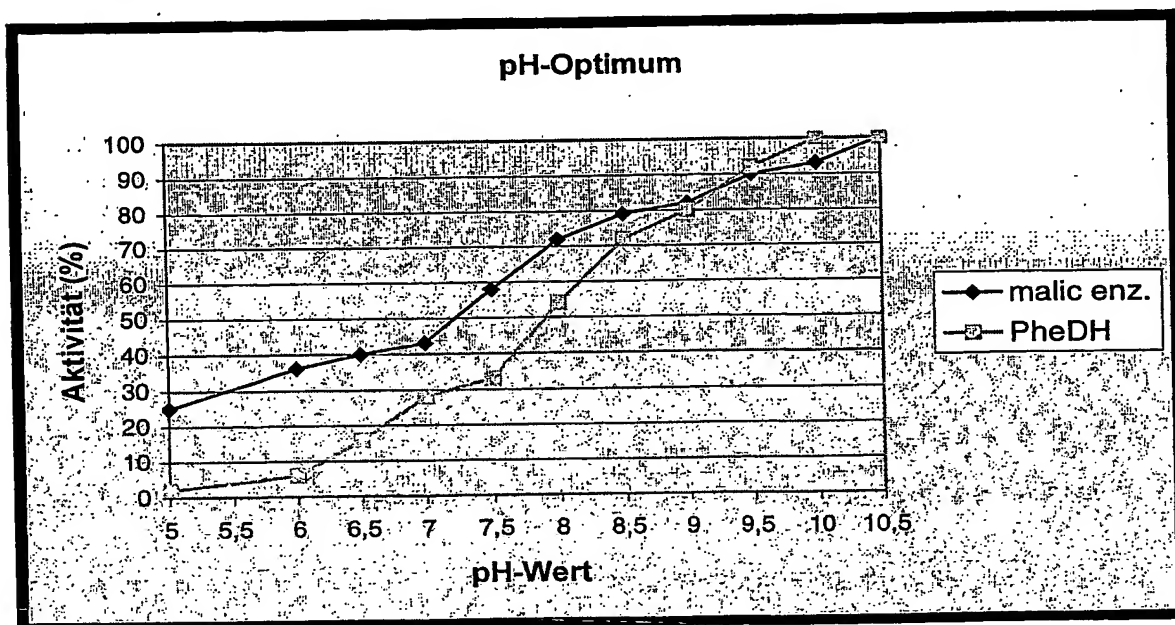


Fig. 11:

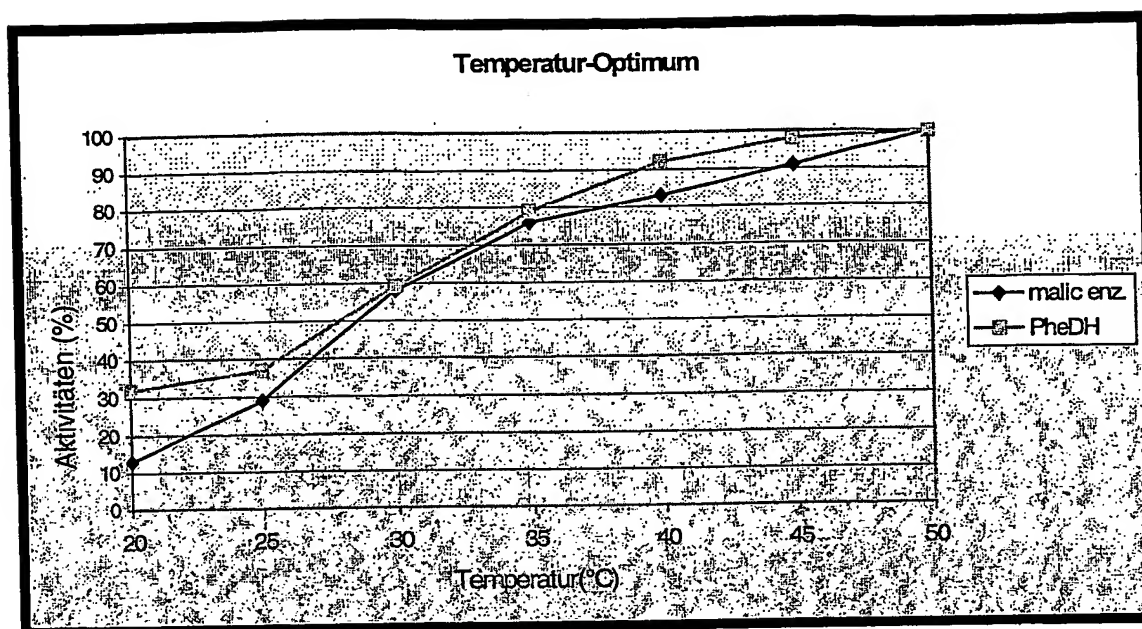


Fig. 12

